

## بررسی برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی سیانوباکتری *Anabaena sp.* جدا شده از تالابهای استان گیلان

رضا کریمی، جنت سرمد\*، میرقاسم ناصرعلوی

دانش آموخته، استادیار و دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

### چکیده

سیانوباکتری‌های رشته‌ای هتروسیست دار جنس *Anabaena* موجود در تالابها نقش مهمی را در تولیدات اولیه بوم سامانه‌های آبی ایفا می‌کنند. در فصول گرم سال شکوفایی یا بلوم این سیانوباکتری‌ها در آبهایی با مواد غذایی فراوان (eutrophication) اتفاق می‌افتد. آنها همچنین منبع مهمی از عوامل سوخت و سازی ثانویه را تولید می‌کنند. در این پژوهش نمونه‌های جنس *Anabaena* از تالاب‌های استان گیلان جداسازی و خالص سازی شد. شناسایی با استفاده از کلید شناسایی معتبر انجام شد. در آغاز بر اساس شمارش سلولی، منحنی رشد سیانوباکتری *Anabaena* پس از کشت در بازه‌ی زمانی ۲۱ روز در اتاقک رشد و در شرایط آزمایشگاهی با دمای  $26 \pm 2$  درجه سلسیوس، فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و شدت نوری ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و در شرایط هوادهی رسم شد. سنجش رنگیزه‌های کلروفیلی به دو روش چینوآمریکاییو سنجش رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی به روش سیجلمن انجام شد. آزمون‌های فیتوشیمی جهت حضور آلکالوئید، تانن، فلاونوئید و ساپونین در عصاره متانولی سیانوباکتری *Anabaena* انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از سنجش مقادیر رنگیزه‌های کلروفیلی، اختلاف معنی داری بین دو روش مورد استفاده در این پژوهش وجود ندارد، در عین حال روش چینی به واسطه غیرسمی و ارزان بودن حلال اتانولی و همچنین انجام سنجش در مدت زمان کمتر به روش آمریکایی ترجیح داده می‌شود. بر اساس نتایج وجود مقادیر قابل توجهی رنگیزه هایفیکوبیلی پروتئینی در سیانوباکتر جنس *Anabaena* نشان داده شد. فیکوبیلی پروتئین‌ها به دلیل رنگ منحصر به فرد و خواص آنتی‌اکسیدانی شان، کاربردهای گسترده‌ای در زمینه‌های پزشکی و درمانی کسب کرده‌اند؛ همچنین آلکالوئید و ساپونین به عنوان مهم‌ترین ترکیب فعال زیستی در سیانوباکتری بومی جداسازی شده از تالابهای استان گیلان نشان داده شد.

**کلمات کلیدی:** سیانوباکتر *Anabaena*، کلروفیل a، حلال، تست فیتوشیمی

**مقدمه:**

سیانوباکتری ها که پیشتر به گروه جلبک های سبز- آبی نیز معروف بودند، یوباکتریهای گرم منفی هستند که تاریخچه تکاملی شان به ۳/۵ بیلیون سال قبل بر می گردد (Thajuddin and Subramanian, 2005). آنها در محیط های مختلف خاکی، آبی و دریایی پراکنده اند و به واسطه تنوع وسیع گونه‌ای و رویشگاهی به عنوان نشانگرهای زیستی (Biomonitoring) زیستگاههای آبی محسوب می شوند. فتوتروف بودن و عدم نیاز به مواد آلی در کشت سیانوباکتری ها از نظر زیست فناوری یک مزیت اقتصادی محسوب می شود که آنها را نسبت به دیگر موجودات ذره بینی برتری می بخشد و از طرفی داشتن مسیرهای سوخت و سازی ویژه امکان دستیابی به ترکیبات جدید در این موجودات ذره بینی را با کاربردهای متنوع در صنایع دارویی، پژوهش های علمی، تولید مواد غذایی برای انسان و دام و آبیان قوت می بخشد (Victory, 2008).

سیانوباکتری ها اغلب در آبهای آلوده و غنی از ازت و فسفر نیز یافت می‌شوند. تولید سم، تغییر رنگ و مزه آب از اختلالاتی است که بلام سیانوباکتری ها به همراه دارند. دو گروه اصلی از سیانو توکسین ها شامل نورتوکسین های آلكالوئیدی و هپاتوکسین های پپتیدی وجود دارند (Patterson and Larsen, 1994). بلام سیانوباکتری ها با توجه به ضریب نسبت سطح به حجم، موجب بی‌ثباتی در بوم سامانه شود. به بیان دیگر، با افزایش فرایند فتوسنتز و در پی آن، به دلیل تراکم زی توده و تغییرات زیست فیزیکی، شرایط بی‌هوازی فراهم می‌شود که در مجموع جدای از اثرات زیست شناختی فراوان دارای اثرات بازدارندگی متنوع و وسیعی بر روی سایر موجودات زنده هستند (Evangelista, 2007).

همه ی موجودات فتوسنتز کننده از جمله سیانوباکترها، کلروفیل a دارند. کلروفیل a در حدود ۱ تا ۲ درصد از وزن خشک جلبک های پلانکتونی را شامل می شود. سه شیوه برای سنجش رنگیزه های کلروفیلی وجود دارد: نورسنجی طیفی، پرتوسنجی و رنگ نگاری مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup>. روش نورسنجی طیفی یک روش ساده است که فقط به شاهد و تجهیزات معمولی که در بیشتر آزمایشگاهها یافت می شوند نیاز دارد اما دو روش پرتوسنجی و HPLC نیازمند تجهیزات پرهزینه هستند. روش شمارش سلولی و سنجش غلظت رنگیزه های کلروفیلی به ویژه کلروفیل a دو پارامتری هستند که در ارزیابی میزان یوتروفیکاسیون نقش دارند. آنها همچنین شاخص های مهمی در تعیین کیفیت آب محسوب می شوند (Huang and Cong, 2007).

<sup>۱</sup>. HPLC, high performance liquid chromat

با وجود مطالعات زیادی که در زمینه ترکیبات فعال زیستی سیانو باکتری ها در سطح بین الملل صورت گرفته است، پژوهش های داخلی، سهم کمی از این مطالعات را درباره ی سیانوباکتری های بومی جدا شده به خود اختصاص داده است. در این راستا این پژوهش به مطالعه، برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی، سیانوباکتریهای جنس آنابنا جداسازی شده از تالابهای استان گیلان اختصاص یافت.

## مواد و روش ها

### جداسازی و خاص سازی :

انواع نمونه های محیطی برای جداسازی سیانوباکتری جنس *Anabaena* از تالاب های استان گیلان برداشت شد. عمل خالص سازی با روش پلیت آگار (Victory, 2008) و با استفاده از محیط کشت زاندر منفی انجام شد (علوی، ). رشته های سیانوباکتریایی رشد یافته بر سطح پلیت با چندین بار کشت مجدد خالص شدند. شناسایی با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلید شناسایی معتبر صورت پذیرفت (Patrick and Shaha, 2012).

### شرایط کشت:

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از درجه خلوص تحلیلی برخوردار بودند. ترکیب محیط کشت مایع زاندر منفی جهت کشت سیانوباکتری آنابنا استفاده شده شامل عناصر:  $FeCl_3$ ;  $NaCl$ ;  $Na_2CO_3$ ;  $CaCO_3$ ;  $KH_2PO_4$ ;  $MgSO_4+7H_2O$ ;  $HCl$ ;  $Na_2EDTA$ ;  $MnCl_2+4H_2O$ ;  $Na_2CO_3+9H_2O$ ;  $H_3BO_3$ ;  $CO(NO_3)_2+6H_2O$ ;  $LiCl$ ;  $KBr$ ;  $Al_2(SO_4)_3+18H_2O$ ;  $ZnSO_4+7H_2O$ ;  $CuSO_4+5H_2O$ ;  $KI(NH_4)_6$ ;  $MO_7O_{27}+4H_2O$  بود. جهت حذف آلودگی های میکروبی و قارچی، محیط کشت مورد نظر نخست با استفاده از دستگاه اتوکلاو در فشار ۱ اتمسفر، دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و یا با استفاده از نور UV به مدت ۳۰ دقیقه استریل شد. پس از این مرحله، انتقال سیانوباکتری به درون ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت در شرایط استریل انجام شد. پس از تلقیح، درب ارلن با پنبه مسدود شد. جهت رشد بهتر، ارلنها به اتاقک کشت منتقل و در شرایط پایه (  $26 \pm 2$  درجه سلسیوس و شدت نوری ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و با هوادهی ۲۰۰ میلی لیتر در دقیقه) قرار گرفتند. در طول دوره رشد، از کشتها به شکل پیوسته نمونه گیری و شرایط رشد در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. جهت نگهداری طولانی مدت، ۱ میلی لیتر از

سوسپانسیون سیانوباکتری در محیط مایع در ویال‌های درپنج‌دار ۲ میلی‌لیتری، دی‌متیل سولفوکساید ۱۰٪ اضافه شد و ویال‌ها در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### سنجش‌های فیزیولوژیک

#### شمارش سلولی

شمارش تعداد سلول‌ها در بازه زمانی ۲۱ روز هر ۳ روز در میان و با استفاده از لام هموسایتومتر مطابق روش Schoen (1988) انجام گرفت. به دلیل رشته‌ای بودن آنابنا نخست میانگین تعداد سلول از ۲۰ رشته‌ی تصادفی گرفته شد. سپس در تعداد رشته در میلی‌لیتر که با استفاده از رابطه زیر محاسبه می‌شود ضرب شد.

$$\text{ضرب رقت} \times 10^4 \times \text{میانگین تعداد سلول در } 5 \text{ مربع} = \text{تعداد سلول ها در هر میلی لیتر}$$

#### استخراج و سنجش رنگریزه کلروفیل a

استخراج و سنجش رنگریزه کلروفیل a در دوره‌ی رشد آنابنا، بر اساس دو روش متفاوت چینی (NMM) و آمریکایی (USM) به شرح زیر صورت گرفت (Huang and Cong, 2007).

#### روش USM (آمریکایی)

در این روش از حلال استون ۹۰ درصد استفاده شد. تغلیظ سیانوباکتر توسط فیلتر فایبر استیک اسید با قطر ۵۰ میلی‌متر و منافذ ۰/۸ میکرومتر و پمپ خلأ انجام شد؛ سیستم سیانوباکتریایی با ۲ تا ۳ میلی‌لیتر استون ۹۰٪ توسط هاون تخریب سلولی شد و به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه در تاریکی قرار داده شد. در مرحله بعد عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۷۵g مرکز گریز شدند پس از آن عصاره‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر از حلال استون ۹۰ درصد رقیق شدند. سپس جذب در طول موج‌های مورد نظر خوانده شد. از نکات مهم، رعایت موارد زیر است. میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر نباید بیشتر از ۰/۰۰۵ باشد در غیر این صورت باید گریز از مرکز ادامه یابد. همچنین مقدار جذب در طول موج ۶۶۴ نانومتر باید بین ۱-۰/۱ باشد در غیر این صورت عصاره باید رقیق تر شود یا از کووت بلندتری استفاده شود. کلروفیل a با فرمول زیر محاسبه شد. مقدار کلروفیل بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در سلول محاسبه شد. سنجش کلروفیل a در یک بازه زمانی ۱۸ روز هر سه روز در میان انجام شد.

$$chl\alpha = \frac{[11.85(D664 - D750) - 1.54(D647 - D750) - 0.08(D630 - D750)] \times V_E}{V_E \times \delta}$$

VE: مقدار عصاره (ml)

Vs: مقدار سوسپانسیون سیانوباکتر که فیلتر شد (ml)

: طول قسمت نوری قاعده ی کووت (cm)

### متد جدید NMM (چینی)

در این روش از حلال اتانول ۹۰ درصد استفاده شد. روش سنجش و فرمول های مورد استفاده مانند متد آمریکایی بود با این تفاوت که مدت زمان عصاره گیری در این روش نیم ساعت و کوتاه تر از روش قبلی است و همچنین تفاوت در ضریب جذبی حلال های مورد استفاده که در باره ی استن مورد استفاده، ۸۹٪ است در حالی که برای اتانول ۸۷٪ است که باید در سنجش های مربوطه در نظر شود.

$$chl\alpha = \frac{[12.2(D664 - D750) - 1.58(D647 - D750) - 0.08(D630 - D750)] \times V_E}{V_E \times \delta}$$

VE: مقدار عصاره (ml)

Vs: مقدار سوسپانسیون سیانوباکتر که فیلتر شد (ml)

: طول قسمت نوری قاعده ی کووت (cm)

### سنجش فیکوبیلی پروتئین ها

سنجش فیکوبیلی پروتئین ها بر اساس روش سیجلمن انجام شد (Hemlata Tasneem Fatma, 2009). نخست یک میلی لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتریایی آنابنا حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ گریز از مرکز شدند و مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد، به آن بافر فسفات پتاسیم (pH=7) اضافه شد و مخلوط چندین بار در شرایط تاریکی با ازت مایع شوک فریز و سپس ذوب گردید این عمل تا زمانی که کلیه رنگیزه ها خارج و رسوب سیانوباکتر بی رنگ شود، ادامه یافت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. جهت تهیه شاهد (بلانک) از بافر فسفات پتاسیم استفاده شد. جذب سوپر ناتانت در طول موج های ۶۵۲ و ۶۱۵ قرائت شد و با توجه به فرمول های زیر سنجش هر یک از بیلی پروتئین ها انجام شد ( فیکوسیانین PC ؛ آلفوفیکوسیانین APC و فیکواریترین PE ).

$$PC = [A615 - (0/474 \times A652)] / 5.34$$

$$APC = [A562 - (0/208 \times A615)] / 5.09$$

$$PE = A562 - (2.41 \times PC) - (0/849 \times APC) / 9.62$$

## سنجش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی (۱) شناسایی آکالوئیدها:

روش‌های عمومی که برای جدا کردن آکالوئیدها مورد استفاده قرار می‌گیرند بر پایه داشتن خاصیت قلیایی آنها و تشکیل نمک است که در واکنش با اسیدها تولید می‌کنند. نخست ۰/۵ گرم عصاره متانولی آنابنا را در ۱۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال روی بن ماری توسط میله بلوری حل کرده و پس از سرد کردن محلول مقدار ۰/۵ گرم کلرور سدیم به آن اضافه و پس از هم زدن صاف شد. رسوب روی صافی را با محلول اسید کلریدریک شسته تا حجم محلول به ۱۰ میلی لیتر برسد. محلول صاف شده به ۳ لوله به طور مساوی انتقال یافت. در صورت وجود آکالوئیدها با افزودن چند قطره مایر رسوب سفید مایل به زرد ایجاد می‌شود. در ادامه می‌توان از آزمایش تأییدی استفاده کرد. بدین منظور به یکی از لوله‌ها مقدار کافی آمونیاک غلیظ اضافه نموده تا محلول قلیایی شود و سپس محلول قلیایی را به آمپول دکانتاسیون کوچک منتقل کرده و آن را سه بار و هر بار با ۲۰ میلی لیتر کلروفرم استخراج نموده سپس فاز کلروفرمی را تغلیظ کرده و به آن ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال افزوده و بعد از کمی حرارت روی بن ماری به آن چند قطره معرف مایر اضافه نموده و نتیجه به صورت کدورت کم (+)، کدورت زیاد(++)، تولید رسوب(+++) و تولید رسوب سنگین(++++) گزارش می‌شود (Tiwari et al., 2011)

## (۲) شناسایی ساپونین

برای اثبات وجود ساپونین‌ها از خاصیت کف زایی آن استفاده شد. بدین ترتیب که مقدار ۰/۱ گرم پودر سیانوباکتر مورد آزمایش داخل لوله تمیز و خشک افزوده شد و سپس با افزایش مقدار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن لوله به مدت ۱۰ ثانیه به شدت تکان داده شد. حضور ساپونین فراوان موجب مشاهده کف به ارتفاع ۱-۱۰ سانتی متر روی محلول شد که حداقل برای مدت ۱۰ دقیقه پایدار است. اگر کف مذکور نیم ساعت باقی بماند دارای ساپونین متوسط (++) و به همین صورت اگر یک ساعت باقی بماند مقدار ساپونین قوی (+++) خواهد بود (Tiwari et al., 2011).

## (۳) شناسایی تانن

۰/۱ گرم عصاره ی متانولی سیانوباکتر آنابنا را در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر جوشیده حل و با سرد شدن محلول ، ۲ تا ۴ قطره محلول ۱۰ درصد کلرورسدیم به آن اضافه شد و به این وسیله ترکیبات غیر تانن رسوب می‌کنند. محلول صاف شده را در ۴ لوله آزمایش ریخته، لوله ۱ را به عنوان شاهد انتخاب نموده و به لوله ۲ مقدار ۴ تا ۵ قطره محلول یک درصد ژلاتین اضافه شد. در صورت وجود تانن رسوب مشاهده می‌شود. در لوله دیگر ۴ تا ۵ قطره ژلاتین نمک دار ( یک درصد

ژلاتین به علاوه ۱۰ درصد نمک کلرورسدیم) ریخته در صورت وجود تانن رسوب مشاهده می‌شود. به لوله چهارم ۳ تا ۴ قطره محلول کلرور فریک افزوده شده که در صورت وجود تانن ایجاد رنگ آبی یا سبز در رسوب مشاهده می‌شود (Tiwari et al., 2011).

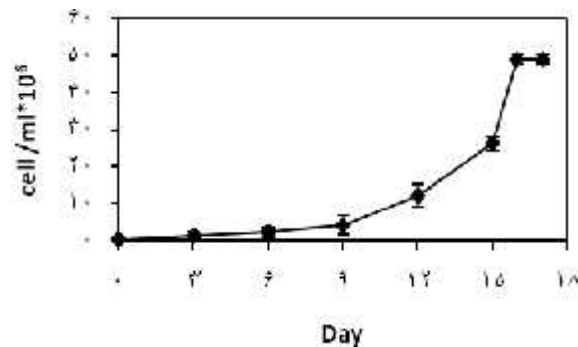
#### ۴) شناسایی فلاونوئیدها

به ۱ گرم پودر سیانوباکتر ۲۰ سی سی متانول اضافه کرده و ۱۰ دقیقه گرما داده می‌شود؛ سپس محلول را صاف می‌شود و مجدداً گرماداده تا تغلیظ شود. پس از انتقال به یک لوله آزمایش ۲ سی سی اسید کلریدریک غلیظ به آن اضافه می‌شود و به اندازه ۱ سر اسپاتول براده منیزم برداشته شده و به آرامی به آن افزوده می‌شود و بعد از سرد شدن به اندازه حجم داخل لوله آب اضافه می‌شود و به همان مقدار الکل آمیلیک افزوده می‌شود، صورتی تا ارغوانی شدن فاز الکل موید وجود فلاونوئید است (Tiwari et al., 2011).

#### نتیجه‌گیری و بحث

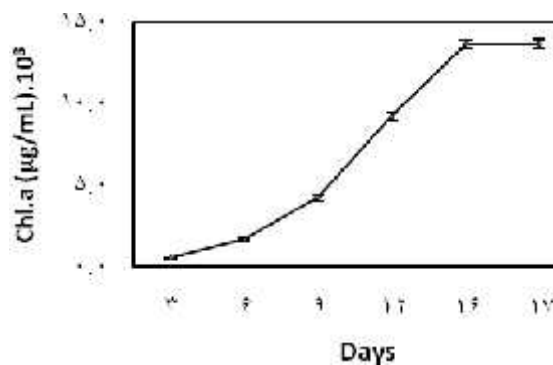
##### بررسی منحنی رشد

با توجه به فراوانی و اهمیت سیانوباکتر هادر میکروفلور تالاب های استان گیلان و تشکیل بلوم در برخی مناطق این تالاب ها، که منجر به بروز پیامد های ناهنجار اکوفیزیولوژیکی می‌شود. در این بررسی سیانوباکتری جنس آنابنا، بومی تالاب های گیلان جدا سازی شد. مشابه هر میکروارگانیسم دیگر به دنبال فراهم بودن عوامل فیزیکی و مواد لازم برای رشد، سیانوباکترها تکثیر می‌شوند و پس از طی مراحل رشد، توده سلولی مناسب ایجاد می‌کنند. شکل ۱، منحنی رشد سیانوباکتری آنابنای جدا شده از تالابهای استان گیلان را بر اساس شمارش سلولی در طی ۲۱ روز نشان می‌دهد. بر اساس بررسی این منحنی رشد به مدت ۳ روز پس از تلقیح، تحت شرایط آزمایشگاهی موجود، این سیانوباکتر در فاز تاخیری رشد بسر می‌برد و از روز چهارم وارد مرحله رشد سریع شده و در روز ۱۶ وارد فاز ایستایی رشد شده است.



شکل ۱: منحنی رشد سیانوباکتری جنس آنابنای جداشده طی ۲۱ روز در شرایط پایه آزمایش داده ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) هستند.

یکی از معیارهای سنجش بیومس جلبکی در دریاچه‌ها و رودها سنجش محتوای کلروفیل a است. کلروفیل a به عنوان یک رنگیزه غالب در حدود ۱ تا ۲ درصد وزن خشک سیانوباکترها را شامل می شود (Elizabeth, 1997). همچنین محتوای این رنگیزه به عنوان ارتباط دهنده تجربی بین غلظت مواد غذایی یا پدیده ی یوتروفیکاسیون (تجمع مواد آلی) در مخازن و آبگیرها محسوب می شود. شکل ۲ روند تغییرات کلروفیل a را در آنابنای جدا شده طی ۲۱ روز پس از تلقیح نشان می دهد. در این بررسی جذب عصاره ی اتانولی سیانوباکتر آنابنا طبق روش (Hung and Cong, 2007) هر سه روز در طول موج های ۶۳۰، ۶۶۴ و ۷۵۰ خوانده شد. بر این اساس روند تغییرات روزانه کلروفیل a الگوی تقریباً مشابهی نسبت به منحنی روزانه رشد سلول ها نشان می دهد.

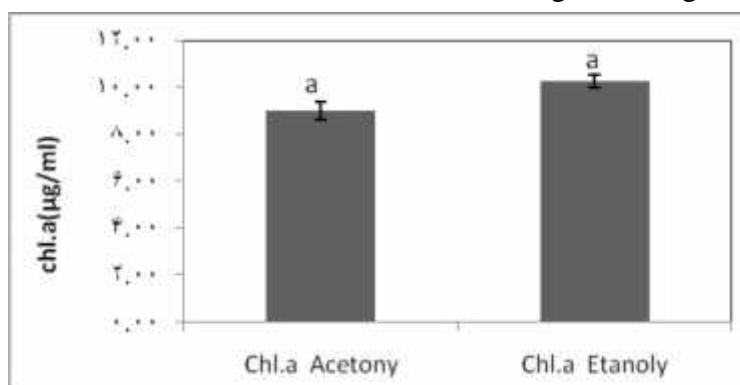


شکل ۲: روند روزانه تغییرات کلروفیل a بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در سیانوباکتر آنابنا جداشده طی ۲۱ روز در شرایط پایه آزمایش. داده ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) هستند.



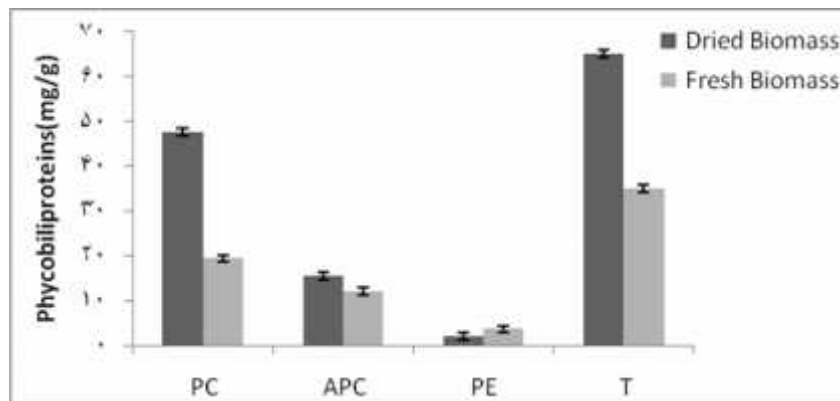
### بررسی سنجش بهینه کلروفیل a و فیکوبیلی پروتئین ها

سنجش بهینه کلروفیل a با دو روش استخراجی با دو حلال استون و اتانول ۹۰ درصد نشان داد که تفاوت معنی داری بین مقادیر کلروفیل a در دو روش آمریکایی و چینی مشاهده نمی شود (شکل ۳)، در حالی که روش آمریکایی (استفاده از حلال استنی) در مقایسه با روش چینی (استفاده از حلال اتانول) طولانی تر و در حدود دو ساعت برای استخراج و سنجش کلروفیل به زمان نیاز دارد. برتری دیگر اتانول غیر سمی بودن و امنیت بیشتر آن برای پژوهشگر و همچنین ارزان تر بودن آن است. در آزمایشی که تینگ-لین هونگ و های بینگ کونگ در سال ۲۰۰۶ در ۱۲ نمونه جلبک آب شیرین انجام دادند، استخراج و سنجش کلروفیل a با سه روش NMM، (با استفاده از فیلتر فایبر استیک اسید و اتانول ۹۰٪)، روش USM، (توسط فیلتر واتمن و استن ۹۰٪) و روش CHM، (توسط فیلتر فایبر استیک اسید و استن ۹۰٪) مقایسه شدند. نتایج ما همسو با کار آنان بود. آنها نشان دادند که میزان کلروفیل تعیین شده با روش NMM (چینی) به روش USM (آمریکایی) نزدیک است در حالی که میزان کلروفیل تعیین شده توسط CHM اختلاف زیادی با USM داشت (Hung and Cong, 2007)



شکل ۳: مقایسه دو روش اتانولی (NMM) و استنی (USM) در سنجش کلروفیل a در سیانو باکتری آنابنای جدا شده از تالابهای استان گیلان. داده ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) هستند.

اختلاف غیر معنی دار بر اساس آزمون دانکن با حروف مشترک نشان داده شده است ( $P < 0.01$ ) سنجش فیکوبیلی پروتئین ها بر روی نمونه تازه و پودر شده ی سیانوباکتر آنابنا انجام شد. بیومس خشک شده مقادیر بالاتری از فیکوبیلی پروتئین را در مقایسه با نمونه ی تازه نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴: سنجش فیکوسیانیین (PC)، آلفیکوسیانیین (APC) ، و فیکواریترین (PE) در شرایط پایه آزمایش در سیانو باکتری آنابنای جدا شده از تالابهای استان گیلاندر سیانوباکتر آنابنا جدا شده طی ۲۱ روز در شرایط پایه آزمایش داده ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) هستند.

### بررسی سنجش‌های فیتوشیمی

ترکیبات فیتوشیمیایی از جمله ترکیبات خاص گیاهی اند که به عنوان حاصل های سوخت و سازی ثانویه عمل می کنند (Oktay et al., 2003 and Wangenstein et al., 2004) در آزمایش فیتوشیمیایی مقدماتی در این تحقیق وجود آلكالوئید ها و ساپونین فراوان در عصاره متانولی سیانو باکتر آنابنای بومی چداسازی شده نشان داده شد (جدول ۱) نتایج حاصل از شناسایی برخی ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره متانولی آنابنا در جدول ۱ نشان داده شده است. وجود آلكالوئید و ساپونین به عنوان مواد موثره موجود در عصاره آنابنا شناسایی شد.

جدول ۱: نتایج سنجش های فیتوشیمیایی مقدماتی در سیانو باکتری آنابنای جدا شده از تالابهای استان گیلان

نتایج	مشاهده مثبت	معرف به کار رفته	ماده موثره موجود در عصاره
+++	ایجاد کدورت و رسوب	آزمون مایر	آلكالوئید
+	ایجاد کف پایدار	آزمون ایجاد کف	ساپونین
-	رنگ ارغوانی	آزمون شینوده	فلاونوئید
-	ایجاد رنگ آبی یا سبز در رسوب	آزمون کلرور فریک	تانن

طبق پژوهش های ایبانا و همکارانش آلكالوئیدها به عنوان مواد موثره موجود در سیانوباکترها، اثرات بازدارندگی بر برخی باکتری های پاتوژن دارند و رشد آنها را مهار می کنند (Ebana et al., 1991).

آنها همچنین دارای اثرات فیزیولوژی جالبی هستند از این رو در پزشکی و در داروسازی مصرف زیادی دارند. وجود ترکیبات متنوع آلكالوئیدی در سیانوباکتر آنابنا در مطالعات مختلفی نشان داده شده است از آن جمله در مطالعه ای در سال ۲۰۰۱ حدود ۴۲۴ ترکیب از فراکسیون های حاصل از سیانوباکترهای دریایی نشان داده شد که ۴۰٪ این ترکیبات ساختار لیپوپپتیدی داشتند و بقیه ترکیبات شامل آلكالوئیدها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب و آمیدها بودند (Burja et al., 2001) از نظر زیست شناختی، ساپونین های گیاهی نیز از ترکیبات دفاعی در برابر میکروب های پاتوژن و علفخواران محسوب می شوند (Osborn, 1996). ساپونین ها دارای خواص مفیدی نیز برای انسان هستند. به عنوان مثال گیاهان *Panax* و *Glycyrrhiza* از منابع داروهای گیاهی حاوی ساپونین و گلیسییریزین با اثرات دارویی متنوع محسوب می شوند (Shibata, 2000 & 2001).

### جمع بندی نهایی

گسترش مقاومت میکروبی، نیاز به تحقیقات دارویی راه، برای جایگزینی داروهای شیمیایی ضروری کرده است. که از ارزنده ترین جایگزین ها، حاصل سوخت و ساز ثانویه آنتی بیوتیکی سیانوباکتری هاست. مطالعات ما نشان داد که سیانوباکتر آنابنا بومی جداسازی شده متشکل از مقادیر قابل ملاحظه ترکیبات فیتوشیمیایی با ماهیت آلكالوئیدی و ساپونینی و آنتی اکسیدانی است. از سوی دیگر یکی از خطرات کار کردن در آزمایشگاهها استفاده از مواد آزمایشگاهی سمی است، استن یکی از این مواد است که می تواند سلامت آزمایشگر را به خطر بیندازد. در استخراج کلروفیل a که شاخص مهمی در سنجش بیومس سیانوباکتری هاست می توان حلال اتانول را جایگزین آن کرد. اتانول علاوه بر ایمن تر بودن ارزان تر است و زمان استخراج آن نیز در روش NMM (چینی) کمتر از روش USM (آمریکایی) است.

### منابع

- [۱] علوی میر قاسم، (۱۳۸۰)، تأثیر فلزات سنگین بر رشد جلبک ها، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دریا، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اهواز، ۲۳.
- [2] Burja A, Banaigs B, Abou-mansour E, and Burgess G. (2001). Marine cyanobacteria-aprolific source of natural products. J. Tetrahedron, 57, 9347-9477.
- [3] Eban R, Madunagu B, Ekpe E, and Otung I. (1991). Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*,

- Borreria cymoides*, *Kola nitida* and *Citrus aurantifolia*. J. Appl. Biotechnol, 71: 398 – 401.
- [4] Elizabeth, JA. (1997). Method 446.0, in vitro determination of chlorophylls a, b, c1 + c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. U.S. Environmental Protection Agency. pp. 1–26.
- [5] Patterson GML and Larsen IK. (1994). Bioactive natural products from blue- green algae. Journal of Applied Phycology, 353:181- 192.
- [6] Hemlata Tasneem Fatma. (2009). Screening of Cyanobacteria for Phycobiliproteins and Effect of Different Environmental Stress on Its Yield. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 83:509–515.
- [7] Ktay M, Gulcin I, and Kufrevioglu OI. (2003). Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. LWT, 36: 263-271.
- [8] Osbourn AE. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell, 8:1821–1831.
- [9] Patrick M, Shiha B, and Dongying W. (2012). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. Edited by Robert Haselkorn, University of Chicago.
- [10] Schoen M. (1988). Cell counting. In: Experimental physiology (eds. Lobban, C. Chapman, D., and Kermer, B. P.) Cambridge University Press.
- [11] Shibata S. (2000). A drug over the millennia: Pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. Yakugaku Zasshi, 120: 849–862.
- [12] Shibata S. (2001). Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. J. Korean Med. Sci, 16:S28–S37.
- [13] Thajuddin N, and Subramanian G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. Current Science, 89,1.
- [14] Huang T-L and Cong H-B. (2007). A New Method for Determination of Chlorophylls in Freshwater Algae, 129:1–7.
- [15] Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, and Kaur H. (2011). Phytochemical Screening & Extraction. International Pharmaceutica Scientia, 1(1).
- [16] Valtere E, Laura B, Anna MF, Vincenzo P, and Paolo Gi. (2007). Algal Toxins: Nature, Occurrence Effect and Detection.
- [17] Victory KJ. (2008). Isolation and characterization of antimicrobial compounds synthesized by *Microcystis* SP. Phd Thesis, School of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Computer and Mathematical Sciences. pp. 36-38.81-90
- [18] Victory KJ. (2008). Isolation and characterisation of antimicrobial compounds synthesised by *microcystis* sp, A Thesis submitted for the

- degree of Doctor of Philosophy S Singh; K Bhushan; U Banerjee. Crit. Rev. in Biotech, 25 (3): 73-95.
- [19] Wangenstein H, Samuelsen AB, and Malterud KE. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. Food Chem, 88: 293-297.

---

Aquatic Physiology and  
Biotechnology  
Vol. 1 No. 1, Fall 2013

---

## Physiological and phytochemical properties study of some cyanobacteria *Anabaena* sp. in Guilan Ponds

Reza Karimi , Jannat Sarmad\* , Mir Ghasem Naser Alavi  
MSc, Assistant Professor and PhD Student,  
Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan

---

### Abstract

Heterocystous filamentous cyanobacteria *Anabaena* sp. plays an important role in primary production of aquatic ecosystems wetlands. In the summer cyanobacteria bloom can occur in the nutrient rich waters (eutrophication). They also produced an important source of secondary metabolites. In this study *Anabaena* sp. from Guilan wetlands were isolated and purified. Identification was carried out using reliable identification. At first, growth curve of *Anabaena* sp. were measured in three replicates for 20 days in growth chamber in terms of temperature,  $24 \pm 2$  °C, photo period 16 hours light and light intensity  $60 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{S}^{-1}$ . In order to measure chlorophyll pigments, two different methods were used: 1) 90% ethanol (China method) and 2) 90% acetone (American method) and the phycobiliproteins assay were performed based on Siegelman method. Phytochemical tests for the presence of alkaloid, tannin, flavonoid and saponin in the ethanol extract were used. Based on the results of measuring the amount of chlorophyll pigments, no significant difference between the two methods. However China method due to the non-toxic and inexpensive solvent and also measure timeless is preferred. Based on results, the presence of significant amount of phycobiliprotein pigments in cyanobacter were shown. Unique color and antioxidant properties of phycobiliprotein pigments due to the wide applications in the fields of medicine and health care. The alkaloids and saponins were shown as the major bioactive compounds in cyanobacteria isolated from the native wetlands in Guilan.

**Key word:** *Anabaena* sp, solvent, chlorophyll a, Phytochemical tests

---

\* sarmad@guilan.ac.ir